

成都府河水体细菌动态变化及耐药性*

黎丽雯^{1,2,3}, 邹立扣^{1**}, 周 杨^{1,2}, 胡 苏^{1,2}, 庞玉娟¹

(1: 四川农业大学都江堰校区微生物学实验室, 都江堰 611830)

(2: 四川农业大学城乡建设学院, 都江堰 611830)

(3: 中国科学院南京地理与湖泊研究所, 南京 210008)

摘 要: 将府河从都江堰宝瓶口段至望江公园段分设 9 个监测点, 在秋冬、春夏两季分别取水, 首次建立由细菌总数、总大肠菌群数及粪大肠菌群数三个微生物学指标组成的体系, 对府河两季水质进行对比监测分析, 以综合评价水质、分析季节影响因素并反映出污染物来源。以都江堰宝瓶口大肠杆菌耐药率作为背景值, 对整个河段的 9 个采样点分离纯化鉴定得到 102 株大肠杆菌, 用 K-B 法进行对比药敏试验。结果表明, 府河从都江堰段起, 穿过成都市区后, 至望江公园段细菌总数、大肠菌群数及粪大肠菌群数虽有波动, 但细菌总数总体呈增加趋势, 春夏季府河营养富集, 水质有所降低。府河中大肠杆菌耐药性较小, β -内酰胺类耐药率在 0.96% ~ 33.33% 之间, 氨基糖苷类 1.39% ~ 7.84%, 氟喹诺酮类 11.43% ~ 11.76%, 磺胺类复方新诺明为 52.78%, 其中 β -内酰胺类耐药性、氟喹诺酮类耐药性与源头水质有关, 其余与医疗机构排放的废水及生活污水有关, 此研究为控制成都府河水体中的污染防治提供了理论依据。

关键词: 府河; 细菌动态; 水质评价; 耐药性; 大肠杆菌

Dynamics of bacterial diversity and antibiotic resistance of *Escherichia coli* in Fu River, Chengdu

LI Liwen^{1,2,3}, ZOU Likou¹, ZHOU Yang^{1,2}, HU Su^{1,2} & PANG Yujuan¹

(1: Lab of Microbiology, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, P. R. China)

(2: Urban and Rural Development College, Sichuan Agricultural University, Dujiangyan 611830, P. R. China)

(3: Nanjing Institute of Geography and Limnology, Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210008, P. R. China)

Abstract: To analyze the water quality of the Fu River, nine sampling sites were chosen from Baopingkou site in Dujiangyan to Wangjiang Park site in Fu River. Three microbiological indexes, including total number of bacteria, total coliform and the number of fecal coliform, have been selected to evaluate the water quality, analyze seasonal factors and find out the contamination sources in two different seasons. Besides, taking the antibiotic resistance rate of *Escherichia coli* at Baopingkou as background, 102 *E. coli* identified by morphology and 16S rDNA have been selected for following antimicrobial susceptibility testing, and the susceptibility has been performed according to the standard disk diffusion K-B method. The results show that though the total number of bacteria, total coliform and fecal coliform varied from Baopingkou, Dujiangyan to Wangjiang Park, the total number of bacteria shows an increasing trend as the water flows. The nutrients enrich in spring and summer, and water quality decrease. The susceptibility of 13 antimicrobial agents tested against *E. coli* isolated shows that 0.96% ~ 33.33% of the isolates are resistant to β -lactam, 1.39% ~ 7.84% to aminoglycoside, 11.43% ~ 11.76% to fluoroquinolone, and 52.78% to trimethoprim-sulfamethoxazole. The resistance to β -lactam and fluoroquinolone is related with the source of water, however, other resistances are in connection with polluted water discharged from hospital and residential areas. Generally, this study has provided theoretical foundation for the control of pollution in Fu River.

Keywords: Fu River; bacterial diversity; water quality analysis; antibiotic resistance; *Escherichia coli*

* 2011-02-18 收稿; 2011-04-10 收修改稿。黎丽雯, 女, 1988 年生, 硕士研究生; E-mail: mad_god@163.com.

** 通信作者; E-mail: zoulkc@ hotmail.com.

府河与南河统称为府南河,是成都市的母亲河,与人民的生活息息相关,尤其是府河,城区段 19.4 km,市区河段长,影响面广,对其进行研究具有重要意义^[1-2].在对府南河水质的研究中,从细菌动态变化来反映府河微生物状况、污染物来源及季节对水质的影响分析尚未见报道.但已有大量研究表明水体中细菌对水质变化响应较为明显,可以从细菌动态变化方面进行水质研究^[3-5].过去近四十年以来,人们对环境污染的关注仅限于传统的优先污染物,尤其是在环境中持续存在且具急性毒性和致癌性的杀虫剂和工业副产物.对包括处方药、生物制剂和诊断用药在内的具有生物活性,可能造成生态污染的医用、兽用药物的研究很少^[6-7].但是医疗以及家畜、水产的养殖、果树的培育和食品加工过程都使用了大量的抗生素、防腐剂,这无疑造成抗性菌的广泛存在.过去 10 年中,携带耐药性基因的细菌在环境中呈广泛的爆炸性增长,临床上对新发现的多重耐药性菌株的报道也日益增长,甚至出现了“极端耐药性(extreme drug resistance)”这一名词,拥有极端耐药性的菌株无法用现有的治疗手段杀灭^[7].目前还只有德国、瑞士、丹麦等欧洲国家及美国等少数发达国家对医用和畜用药物的环境行为进行了一些初步研究^[8].

本文以成都府河为研究对象,选用细菌总数、大肠菌群数及粪大肠菌群数三个指标对秋冬、春夏两季调查结果进行对比分析,从微生物方面对水质进行分析,分离水体中大肠杆菌并作耐药性分析,以期对府河的进一步治理和为其它水体治理提供微生物学方面的基础数据.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 从都江堰市宝瓶口分离鉴定出的大肠杆菌 102 株,及都江堰宝瓶口至成都府河合江亭河段的水体中分离鉴定出的大肠杆菌 102 株.

1.1.2 抗菌药物 13 种抗生素:氨苄西林(AMP,10 μg/片)、头孢曲松(CRO,30 μg/片)、阿莫西林/克拉维酸(AMC,10 μg/片)、氨基糖苷(ATM,30 μg/片)、头孢噻肟(CTX,30 μg/片)、头孢噻吩(KF,30 μg/片)、庆大霉素(CN,10 μg/片)、卡那霉素(K,30 μg/片)、环丙沙星(CIP,5 μg/片)、诺氟沙星(NOR,10 μg/片)、复方新诺明(SXT,250 μg/片)、托普霉素(TOB,10 μg/片)、奈替米星(NET,30 μg/片),购置于广州迪景微生物有限公司.

1.1.3 培养基 MH(OXIOD)固体、肉汤培养基购自广州环凯微生物有限公司;牛肉膏蛋白胨培养基、麦康凯选择性培养基、伊红美蓝培养基(EMB 培养基)及 EC 培养基等购自成都科析公司或配制.

1.1.4 质控标准菌株 大肠杆菌 ATCC®25922、大肠杆菌 ATCC®35218 由本实验室保存.

1.1.5 实验试剂 DNA 分子量标准 DL2000、dNTP 及 TaqDNA 聚合酶等购置天根生化科技(北京)有限公司.

16S rDNA 引物:27F:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492R:5'-TACGCGTACCTTGTACGACTT-3'引物由上海 Sangon 生物工程公司合成.

1.1.6 实验用具和仪器 Eppendorf 微量移液器、PCR 管、Olympus 显微镜、PCR 仪(Mycycle, Bio-rad)、高速冷冻离心机(Eppendorf 5804R,德国)、电泳仪 DYY-2C 型(北京市六一仪器厂)、电泳成像仪(BIO-RAD)、BD25-5LT 型低温冷冻柜(青岛海尔特种电冰柜有限公司)、电热恒温培养箱 DH3600A 型(天津市泰斯特仪器有限公司)、SW-SJ-2FD 型双人单面净化工作台(苏州净化设备有限公司).

1.2 方法

1.2.1 样品采集 根据 HJ/T52-1999 水质监测采样点设置的原理及要求,背景值区域、河流湍急弯道、河流分支上游、汇流下游、医院、工业及生活污水排水口下游 50 m 等点均设置采样点.将府河从都江堰宝瓶口段至望江公园段分设 9 个监测点(表 1,图 1),

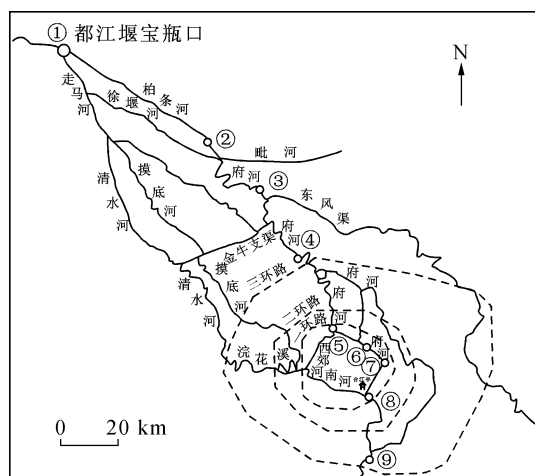


图 1 成都水系图及采样点

Fig. 1 The map of Chengdu river and the location of sampling sites

采样点从上游编号. 使用灭菌采样瓶分别在秋冬季(11—1月)、春夏季(5—7月)对9个样点采集水样. 每次各采样点采集3瓶水样, 以作重复, 每瓶250 ml, 4℃保存, 并于6 h内完成检测.

表1 各采样点周边环境
Tab. 1 The surrounding environment of nine sampling sites

采样点	周边环境
1(都江堰宝瓶口)	都江堰水利景区
2(府河源(团结镇))	郊区、较多度假村
3(安靖镇东风渠水利枢纽起始处)	东风渠水利枢纽、民住区、有排水口
4(府河汇流下游混合均匀处(三环路科技园附近))	郊区、农田、工厂、有排水口
5(西体北路(一环路北一段))	铁路、学校、餐饮、医院、有排水口
6(太升路口)	居住区、医院、有排水口
7(猛追湾)	游泳馆、餐馆、商业区、居住区、医院、有排水口
8(合江亭)	餐饮、商业区、居住区、医院、有排水口
9(望江公园)	学校、餐饮、望江公园、医院、有排水口

1.2.2 各指标的测定 细菌总数的测定采用 GB5749—2006 的平板计数法; 总大肠菌群数和粪大肠菌群的测定采用 GB4749—2007 的多管发酵法(MPN); 大肠杆菌的分离纯化方法为: 将水样加入适量的无菌双蒸水后充分震荡, 进行稀释, 选择合适稀释梯度, 取各稀释液 1 ml 分别用麦康凯选择性培养基在 37℃ 恒温箱中培养 18~24 h; 培养后挑选红色菌落在 EMB 培养基上划线, 获得大肠杆菌疑似菌落; 大肠杆菌的鉴定方法: 选取在 EMB 培养基上生长为金属色及深紫色菌落, 并进行革兰氏染色, 保存疑似大肠杆菌, 提取基因组 DNA, 并扩增 16S rDNA 序列. 取细菌培养物 1.5 ml 于 EP 管中, 12000 转/min 离心 2 min; 沉淀用 TE 缓冲液 567 μl 重悬, 加 20% SDS 30 μl 和 20 mg/ml 蛋白酶 K 3 μl, 混匀, 37℃ 水浴 1 h; 加入 5 mol/L NaCl 100 μl 和 CTAB/NaCl 溶液 80 μl 混匀, 65℃ 水浴 10 min; 加入等体积氯仿/异戊醇(24:1), 12000 转/min 离心 10 min; 吸上清液至新 EP 管中, 加等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 12000 转/min 离心 10 min; 上清液移至新 EP 管, 加 0.6 体积的异丙醇, 12000 转/min 离心 10 min; 弃上清液, 沉淀用 1 ml 70% 乙醇洗 2 次, 弃上清液, 室温放置使乙醇挥发完全; 用 1000 μl ddH₂O 溶解沉淀. -20℃ 保存备用.

PCR 扩增体系 50 μl, 包括 ddH₂O 41 μl, 10× Buffer 5.0 μl, 4× dNTP 1.0 μl, 27F 和 1492R 各 1.0 μl, 模板 DNA 0.5 μl, Taq 酶 0.5 μl. 反应混合物加 30.0 μl 矿物油覆盖. 每个反应为 30 个循环, 每个循环包括 94℃ 变性 1 min, 50℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 首次循环先在 94℃ 预变性 7 min, 最后一次循环后在 72℃ 延伸 10 min. 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像系统(BIO-RAD)观察并保存. 样品送上海生工生物工程有限公司测序, 将测得序列在 GenBank 中 Blast(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对, 选取相关序列利用分子生物学软件分析同源性.

药敏试验采用纸片琼脂扩散法(K-B法), 根据美国临床和实验标准协会(CLSI)推荐的方法进行操作^[10]. 选取已鉴定出的大肠杆菌进行药敏实验, 向装有 4.5 ml 灭菌生理盐水(0.89%)的试管中加入 0.5 ml 菌液. 以无菌脱脂棉蘸取已制备好的菌液, 并在管壁上挤压除去多余的菌液后, 在 MH 固体平板上向一个方向均匀涂布, 然后将平板每转动 60 度涂布 1 次, 共涂布 3 次, 最后沿平板边缘涂布 1 圈. 盖上平皿盖, 置室温干燥 5 min. 用无菌镊子将含药纸片均匀贴于含菌固体平板表面, 各纸片中心距离不小于 24 mm, 纸片距平板内缘应大于 15 mm. 平板经室温放置 15 min 后, 放入 35℃ 培养箱中, 培养 16~18 h^[9,11]. 再将经培养的平板置于无反光背景处阅读结果, 从平板背面用毫米尺测量包括纸片直径在内的抑菌环直径(mm), 抑菌环的边缘以肉眼见不到细菌明显生长为限, 记录结果.

2 结果与分析

2.1 细菌总数

《生活饮用水卫生标准》GB5749—2006 规定细菌总数不超过 CFU/100 ml,就生活饮用水标准对于细菌总数的规定,采样点 1、2 属于极清洁水,采样点 3~9 的细菌总数均比标准高(图 2a)。采样点 4、6、7、9 属于不太清洁水,采样点 5 属于不清洁水,采样点 3 两个监测时间段水质有明显变化。采样点 8 两个调查时间段细菌总数变化较小,基本可以归属为不清洁水。但这也说明府河水源不适合作为直接的生活水源。

从两个季度的对比来看,春夏季有 1、2、4、7、8、9 六个采样点细菌总数大于秋冬季,但基本处于同一数量级。两个季度中细菌总数整体波动趋势是一致的,大致呈增加趋势,并且最大值出现在秋冬季的采样点 5。

2.2 总大肠菌群数

《生活饮用水卫生标准》GB5749—2006 中对生活饮用水的规定是总大肠菌群(MPN/100 ml 或 CFU/100 ml)不得检出。对于总大肠菌群数一项,府河均已不适宜直接作为生活饮用水。秋冬季采样点 3、7、9 数量最多,春夏季采样点 4(2.40×10^5 MPN/100 ml)最多,随后虽有波动但总体逐渐减少(图 2b)。

从两个季度的对比情况来看,秋冬季有 1、3、7、8、9 五个采样点总大肠菌群数大于春夏季,并且数量与春夏季相比有较大差异,均在一个数量级以上。春夏季中的 4、5 采样点总大肠菌群数也远大于秋冬季。

2.3 粪大肠菌群数

根据《地表水环境质量标准》GB3838—2002 对粪大肠菌群数的规定可看出采样点 1 符合Ⅰ类水标准,采样点 2、3 符合Ⅱ类水标准。秋冬季采样点 4、5、6、7、8 符合Ⅲ类水标准,采样点 9 属于Ⅴ类水标准。春夏季采样点 8 属于Ⅳ类水,采样点 5、6、7、9 均属Ⅴ类水,而采样点 4 远超于Ⅴ类标准(图 2c)。但与府南河治理前岷江干流新津至乐山段、锦江、沙河水质污染严重,基本为Ⅴ类和劣Ⅴ类的情况相比有了明显改善^[1]。从两个季度的对比来看,春夏季 7 个采样点粪大肠菌群数均大于秋冬季,最大值为春夏季的采样点 4。

2.4 大肠杆菌分离鉴定

从春夏季府河的 9 个点中共分离鉴定出 102 株大肠杆菌。菌株在麦康凯琼脂平板上长出圆形、光滑、湿润的粉红色菌落,并向培养基内凹陷生长。在伊红美兰琼脂平板上生长成黑色或深紫色带有金属光泽的单个菌落。革兰氏染色为阴性,两端钝圆的短杆菌,多分散,偶有 2~3 个菌体连在一起,无芽孢。16S rDNA 序列电泳结果显示片段大小约为 1500 bp(图 3),比对结果显示其与 Genbank 中序列同源性为 100%,102 株分离菌均为大肠杆菌。

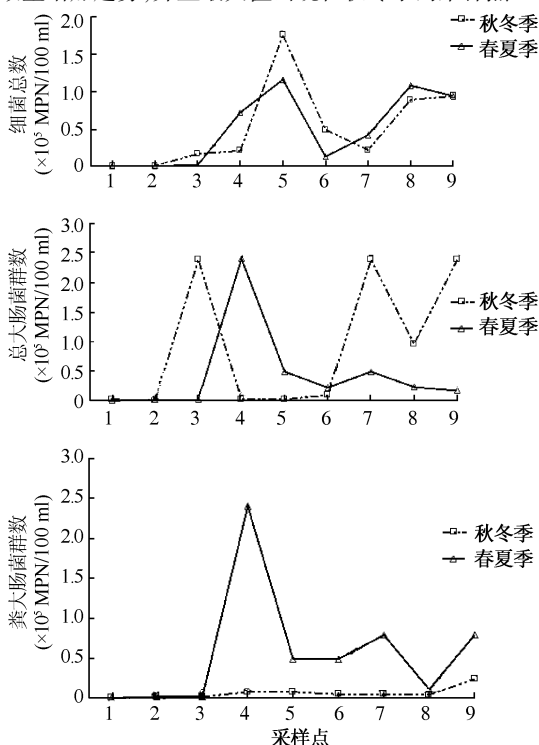


图2 成都府河秋冬、春夏季细菌总数(a)、总大肠菌群数(b)和粪大肠菌群数(c)

Fig. 2 The total number of bacteria (a), total coliform (b) and fecal coliform (c) of Fu River in two different quarters

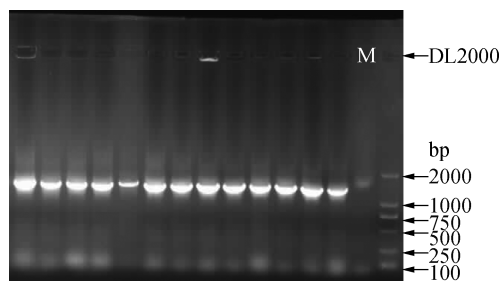


图3 大肠杆菌 16S rDNA 电泳图

Fig. 3 The 16S rDNA electrophoregram of *Escherichia coli*

表2 府河秋冬、春夏两季总大肠菌群数、粪大肠菌群数
在细菌总数中所占比例

Tab. 2 The proportion of total coliform and fecal
coliform in the total number of bacteria of two different quarters

采样点	总大肠菌群数比例/%		粪大肠菌群数比例/%	
	秋冬季	春夏季	秋冬季	春夏季
1	42.59	1.94	3.70	1.94
2	10.00	16.04	14.58	16.04
3	89.96	9.83	9.83	9.83
4	1.04	33.33	3.76	33.33
5	0.13	4.22	0.45	4.22
6	1.92	16.79	1.00	37.40
7	85.23	11.67	2.22	18.81
8	10.79	0.21	0.48	1.02
9	25.32	1.81	2.55	8.40

23.2%, 青霉素类 52.3%, 头孢类 0, 单环内酰胺类 0, 氨基糖苷类 0, 氟喹诺酮类 23.1% ~ 23.2%, 磺胺类复方新诺明 32.7% (表 3).

整个监测河段(从都江堰宝瓶口段到成都望江公园段)水体中 102 株大肠杆菌对这些药物的耐药率分别为:β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂复合物 1.96% ~ 14.15%, 青霉素类 33.33%, 头孢类 1.96%, 单环内酰胺类 0.98%, 氨基糖苷类 1.39% ~ 7.84%, 氟喹诺酮类 11.43% ~ 11.76%, 磺胺类复方新诺明 52.78% (表 3).

表3 都江堰宝瓶口段和整个监测河段 102 株大肠杆菌对 13 种抗生素的耐药率

Tab. 3 The resistance rates of 13 antibiotics in 102 strains of *E. coli* of
Baopingkou section and the whole section of Dujiangyan

抗生素	参考值	宝瓶口段			整个监测河段		
		耐药率/%	中介率/%	敏感率/%	耐药率/%	中介率/%	敏感率/%
AMC	≤13(耐药率)	0	0	100	1.96	0.98	97.06
AMP	≤13(耐药率)	52.3	0	47.7	33.33	4.9	61.77
KF	≤14(耐药率)	23.2	0	76.8	14.15	0	85.85
CTX	≤14(耐药率)	0	22.2	77.8	1.96	6.86	78.99
ATM	≤15(耐药率)	0	0	100	0.98	1.96	97.06
CRO	≤13(耐药率)	0	11.1	88.9	1.96	8.82	89.22
CN	≤12(耐药率)	0	0	100	1.96	3.92	94.12
K	≤13(耐药率)	0	0	100	7.84	0	92.16
CIP	≤15(耐药率)	23.1	0	76.9	11.76	2.94	85.3
NOR	≤12(耐药率)	23.2	0	76.8	11.43	4.76	83.81
SXT	≤12(耐药率)	32.7	0	67.3	52.78	1.39	45.83
TOB	≤12(耐药率)	0	0	100	1.39	0	98.61
NET	≤12(耐药率)	0	0	100	1.39	0	98.61

2.5 细菌总数、总大肠菌群数、粪大肠菌
群数三者之间比例关系

将三种微生物指标结果均转化为
cells/L, 可得各采样点总大肠菌群数、粪
大肠菌群数在细菌总数中所占比例. 采
样点 1、3 秋冬季总大肠菌群数所占比例
大大超过春夏季, 而粪大肠菌群数在细
菌总数中所占比例与春夏季大致相等.
采样点 7、8、9 秋冬季总大肠菌群数在细
菌总数中所占比例比春夏季大. 其余均
是春夏季总大肠菌群数、粪大肠菌群数
在细菌总数中所占比例比秋冬季大
(表 2).

2.6 大肠杆菌的耐药性

都江堰宝瓶口段水体中 102 株大肠
杆菌对 13 种抗生素的耐药率分别为:
β-内酰胺/β-内酰胺酶抑制剂复合物 0 ~

3 讨论

3.1 微生物学监测指标的选择

研究表明水体中细菌测定方法不同,对水质的评价也会产生一定的影响^[12].众所周知,水体中细菌总数往往同水体受有机物污染的程度呈正相关,它是评价水质污染程度的重要指标之一^[13].总大肠菌群是评价水质好坏的一个重要卫生指标,也是反映水体被生活污水污染的一项重要监测项目^[14].所以监测府河总大肠菌群数相当必要.粪大肠菌群数是属于总大肠菌群中的一类在44.5℃下还能生长并发酵乳糖产酸产气的细菌,表征水体受到粪便的污染程度^[15-16].为了更确切地表征府河污染的主要来源,本研究又测定了各采样点粪大肠菌群数,首次建立由细菌总数、总大肠菌群数及粪大肠菌群数三种微生物学指标组成的评价体系.

3.2 季节变化对水质的影响

根据实验结果可以分析出水质受季节影响的程度,秋冬季及春夏季采样点5细菌总数最高,而9个点中除采样点3、4、5外,其余6个采样点春夏季细菌总数均大于秋冬季;春夏季总大肠菌群数在采样点4出现最大值(2.40×10^5 MPN/100 ml);春夏季粪大肠菌群数也普遍较高,有7个点大于秋冬季,2个点与秋冬季相等.春夏季总大肠菌群数几乎全部由粪大肠菌群数构成(表2).

冯胜等研究细菌群落结构对水体富营养化的响应结果表明,水体中细菌的群落结构随着水体富营养化程度的改变产生明显变化,细菌数量呈现随水体营养水平增加而上升的趋势,细菌群落多样性随水体营养水平增加呈现显著的下降趋势^[3].许秋瑾、白洁等对太湖的研究表明,超富营养和接近超富营养湖区的水体中细菌群落多样性表现为减少的趋势^[4-5].四川气象局提供的数据显示,2009年1月至2010年6月成都地区春夏季平均气温为19.43℃,平均降雨量为76.5 mm,秋冬季平均气温为11.43℃,平均降雨量为28.9 mm.春夏季平均气温及降雨量均比秋冬季大.由此可以推测,春夏季温度回暖,微生物代谢活动加剧,数量激增,群落多样性减少,府河营养富集,有机物污染加重.

3.3 水质变化与污染物来源

三个指标组成的评价体系可以综合分析水质变化并初步判断污染物来源.从细菌总数结果来看,虽有波动,但随着府河流向,细菌总数总体呈增加趋势.这与水体经过市区有机物的不断积累密切相关.两个季度细菌总数变化趋势一致,说明在两个季度中有机物排放总量变化基本相同.采样点1、2处于整条河流源头位置,污染最少.采样点5、6、7同处于城区规划一环以内,有大量污水排入水体,并在采样点5达到积累,细菌总数呈现最大值.而采样点6有较为开阔的河边,是典型的敞水区,受周边影响较小,并且正好是与支流汇合后混合均匀处(汇合后1500 m处),水量增大,使污染物得以稀释,同样的,采样点7在采样点6污染物得以有效稀释后又处于极大转弯处,水流再次加大,故细菌总数在采样点5突然增大,而在采样点6、7又突然减小.之后,随着污染物的积累,特别是途经成都一环积累了一定污染物的南河与府河在合江亭汇合后,即采样点7后,细菌总数重新增加.

采样点5细菌总数大但是总大肠菌群数及粪大肠菌群数并不大(表2),说明此处细菌多样性丰富,污染物从生活污水及粪便而来的较少,这与采样点5周围为铁路、学校、餐饮、医院等多重环境相关.采样点3、7总大肠菌群数升高,在秋冬季尤其明显,故可推断这两处污染主要为生活污水所致,粪大肠菌群数不高说明受粪便影响不大,应该是生活污水的其它成分带来主要污染.根据采样点周围环境分析,应该与商业区、居住区等排放的污染物有关.采样点8、9细菌组成有很大部分为总大肠菌群,并且粪大肠菌群数明显,特别是采样点9,说明该两处受生活污水影响,并且粪便影响占有相当比例.

春夏季中,采样点4细菌总数较大,并且总大肠菌群数、粪大肠菌群数占有较大比例,说明此处污染较重,并且污染物有较大部分来源于生活污水中的粪便.这可能与该河段处于郊区,周围有大量农田,春夏季耕种活动频繁,加之未作有效防护,使得污染物受雨水冲刷流入府河有关.

3.4 耐药性分析

研究表明,现行的污水处理技术很难彻底清除医用药物,未被清除的具活性的药物会随出厂污水渗入地下水或地表水造成污染^[17-18].抗生素在人医和兽医临床上的广泛应用导致了细菌耐药性的产生^[19].耐药细菌可能从医院或畜牧场通过各种途径向周围环境传播,甚至可能通过食物链传播给人类,导致人类感染

治疗的失败^[20]. 在水中, 各种来源的细菌(人、动物、环境性的)达到充分混合, 其中也包括受到抗生素、杀菌剂、重金属等影响的细菌, 细菌抗性基因、污染媒介等在水体中也可能造成生态损伤. 所以, 研究水环境耐药性可以从一定程度上反映出污染在环境细菌基因层面上的影响^[21].

大肠杆菌是一类需氧及兼性厌氧的革兰氏阴性无芽孢杆菌, 是肠道中最普遍、数量最多的一类细菌^[22]. 由粪便尤其是肠道病患者的粪便或医院污水污染的水源可引发伤寒、痢疾、霍乱等肠道病流行. 因此, 存在于水体中的大肠杆菌可作为耐药性检测的载体. 近几年的调查显示, 在美国某些河道中, 微生物对氨苄西林的耐药率最高为 73%, 以革兰氏阴性菌为主^[23]; 日本一些河道中, 大肠杆菌对氨苄西林的耐药率可达 81.5%^[24]. 从实验结果可知, 从成都府河水体中分离鉴定出的大肠杆菌对各类抗生素药物耐药性并不大, 较大的只有磺胺类为 52.78%, 氨苄西林为 33.33%. 但是成都府河中大肠杆菌对头孢类、单环内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类复方新诺明明显受环境影响而使得耐药性高于背景值, 这可能与 9 个采样点周边共有 16 个医院、多个生活污水排放口有关. 这些污水中的部分病原菌有可能在水中繁殖, 进而随着饮水或水产品进入人体, 引起疾病的传播, 所以存在潜在的抗生素和耐药微生物的污染, 对其监测不容忽视.

4 结论

本文首次采用细菌总数、总大肠菌群数、粪大肠菌群数三指标相结合的评价系统对河流水质进行分析, 其对水质变化响应较为明显, 既涵盖了生活饮用水的微生物指标也兼顾了地表水水质监测的微生物指标, 又可以初步分析污染物来源, 是一套较为系统的水质微生物分析方法.

通过三指标分析, 污染较重的是采样点 4、5、9, 其中采样点 4、9 应从生活污水特别是粪便的污染上进行治理, 采样点 5 处污染物来源复杂, 应进行进一步分析, 切断各种污染物来源.

两个季度对比分析可看出, 府河水质受温度的影响比水流量变化的影响更大, 春夏季采样点 4、5 应在防治上加大力度, 并作为富营养化敏感区域. 而秋冬季, 采样点 9 处也应加强治理.

成都府河水体中大肠杆菌氨基糖苷类、磺胺类复方新诺明耐药性与医疗机构排放的废水及排放的生活污水有关, 实验中分离鉴定出的大肠杆菌对抗生素药物耐药性并不大, 但在源头部分已对 β -内酰胺类、氟喹诺酮类有一定耐药性, 在今后的工作中依然应加强耐药微生物污染的监测, 并深入研究耐药菌株在人类、动物和环境之间的传播规律, 为控制耐药菌株在自然界的播散采取相应措施以及改善府河水体受耐药微生物污染的情况, 提供科学依据.

致谢: 感谢熊伟、罗龙海及吴聪等同学在本实验完成过程中给予的帮助.

5 参考文献

- [1] 周云章. 成都市“府南河”水环境治理问题的建议. 四川地质学报, 2009, 24(1): 22-24.
- [2] 欧阳林, 董晓川, 梁波. 成都市府南河和沙河综合整治的经验及启示. 重庆经济, 2008, 3: 35-39.
- [3] 冯胜, 秦伯强, 高光. 细菌群落结构对水体富营养化的响应. 环境科学学报, 2007, 27(11): 1823-1829.
- [4] 许秋瑾, 高光, 陈伟民. 太湖微囊藻毒素年变化及其与浮游生物的关系. 中国环境科学, 2005, 25(1): 28-31.
- [5] 白洁, 张吴飞, 李岿然. 海洋异养浮游细菌生物量及生产力的制约因素. 中国海洋大学学报, 2004, 34(4): 594-602.
- [6] Chistian G, Daughton, Thomas A *et al.* Pharmaceuticals and personal care products in the environment agents of subtle change. *Environmental Health Perspectives*, 1999, 107(Suppl 6): 907-941.
- [7] Paterson DL, Doi Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in gram-negative bacilli. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 45(9): 1179-1181.
- [8] Huang CH, Renew JE, Smeby KL *et al.* Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis. *Water Resources Update*, 2001, 120: 30-40.
- [9] Roman H, Thomas T, Klaus H *et al.* Occurrence of antibiotics in aquatic environment. *Science of the Total Environment*, 1999, 225: 109-118.
- [10] M100-S16, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing.
- [11] 孔庆娟, 刘马峰, 白建等. 大肠埃希氏菌和肺炎克雷伯氏菌的药敏试验. 畜牧兽医科学用药, 2005, (1):

64-66.

- [12] 莫崇勋, 黎 曦, 樊新艺. 灰关联分析方法在河道水质评价中的应用研究. 东北水利水电, 2007, (1): 49-52.
- [13] 张清敏, 李洪远, 王 兰. 环境生物学实验技术. 北京: 化学工业出版社, 2005: 80.
- [14] 马春香, 边喜龙. 水质分析. 哈尔滨: 哈尔滨工业出版社, 2008.
- [15] 张胜华. 水处理微生物学. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [16] 时 红, 孙新忠, 范建华等. 水质分析方法与技术. 北京: 地震出版社, 2001.
- [17] Ash RJ, Mauck B, Morgan M. Antibiotic resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. *Emerging Infection*, 2002, **8**(7): 713-716.
- [18] Mulamattathil SG, Esterhuysen HA, Pretorius PJ. Antibiotic-resistant gram-negative bacteria in a virtually closed water recirculation system. *Journal of Applied Microbiology*, 2000, **88**(6): 930-937.
- [19] Guardabassi L, Dalsgaard A, Olesen JE. Phenotypic characterization and antibiotic resistance of *Acinetobacter* spp. isolated from aquatic sources. *Journal of Microbiology*, 2008, **87**(5): 659-667.
- [20] 高迎春, 魏秀丽, 蔡芳芹等. 动物应用抗菌药的风险及防控对策. 中国兽医杂志, 2006, **40**(2): 43-48.
- [21] Fernando B, Jose' LM, Rafael C. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, **19**: 260-265.
- [22] Brock TD, Madigan MD. Biology of microorganisms(6th ed). Prentice-Hall: Englewood Cliffs NJ, 1991.
- [23] Ash RJ, Mauck B, Morgan M. Antibiotic resistance of gram negative bacteria in rivers, United States. *Emerging Infection*, 2002, **8**(7): 713-716.
- [24] Seino A, Hasegawa Y, Masunaga S. Distribution of antibiotic resistant *E. coli* in Kaname, Tsurumi, and Tama Rivers. *Journal of Japan Society on Water Environment*, 2004, **27**(11): 693-698.